

Le séquençage à haut-débit, une nouvelle technique de détection des virus chez la vigne

- Le séquençage à haut-débit (HTS):
 - Qu'est ce que c'est?
 - D'où ça vient?
 - A quoi ça sert?
- Utilisation des HTS comme outil de diagnostic
 - Détection de très nombreux virus ces dernières années grâce aux HTS
 - Description du virome chez la vigne
- HTS, gage d'un contrôle qualité / vers une utilisation pour la certification?

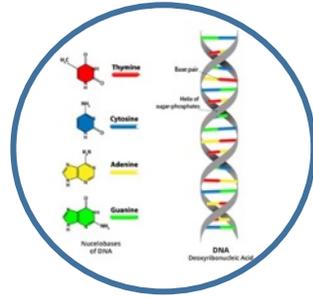
Le séquençage à haut-débit, ou HTS (HighThroughput Sequencing) Qu'est ce que c'est?



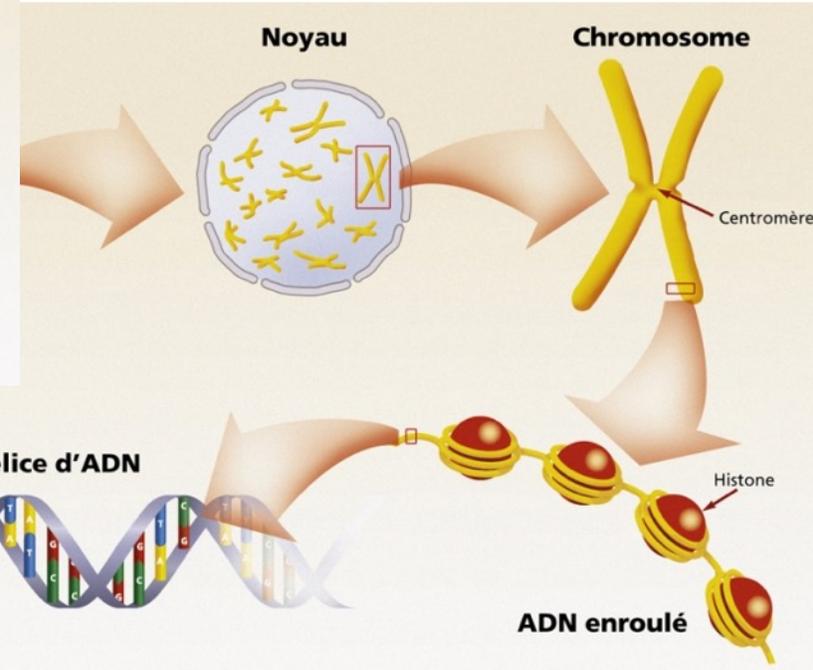
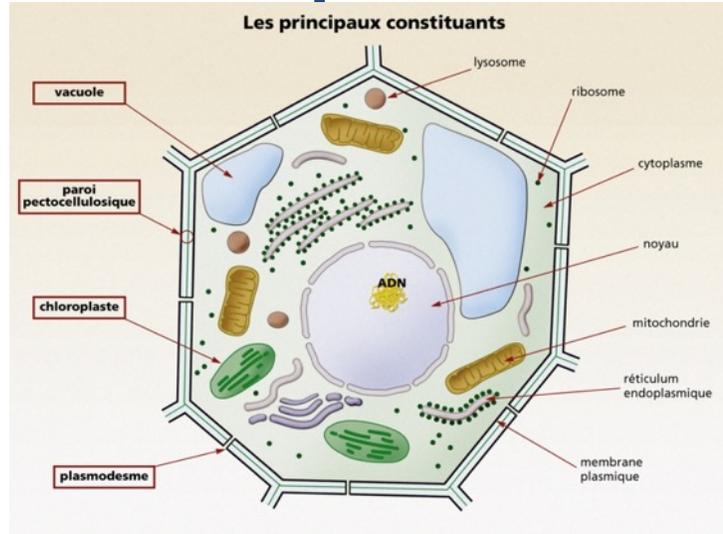
Permet de séquencer tous les acides nucléiques d'un échantillon:

Le séquençage à haut-débit, ou HTS (HighThroughput Sequencing)

Qu'est ce que c'est?



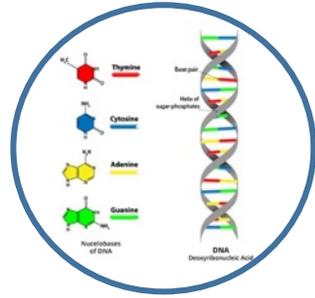
ADN



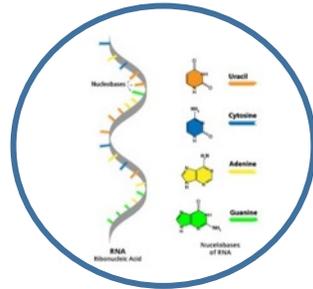
Permet de séquencer tous les acides nucléiques d'un échantillon:
-ADN (information génétique ou génome)

Le séquençage à haut-débit, ou HTS (HighThroughput Sequencing)

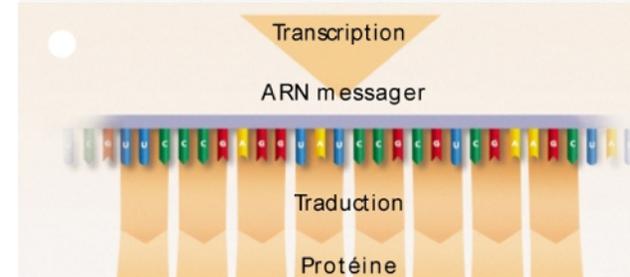
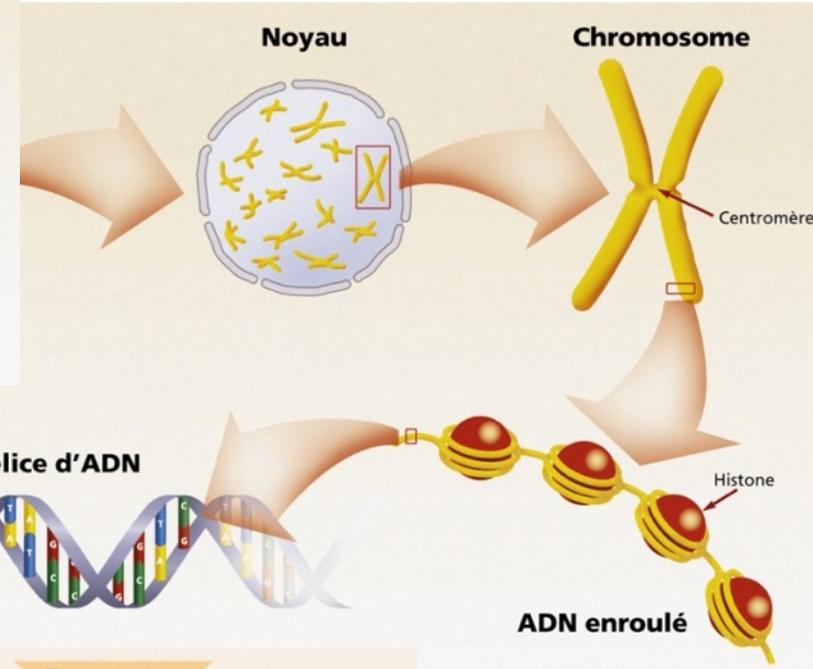
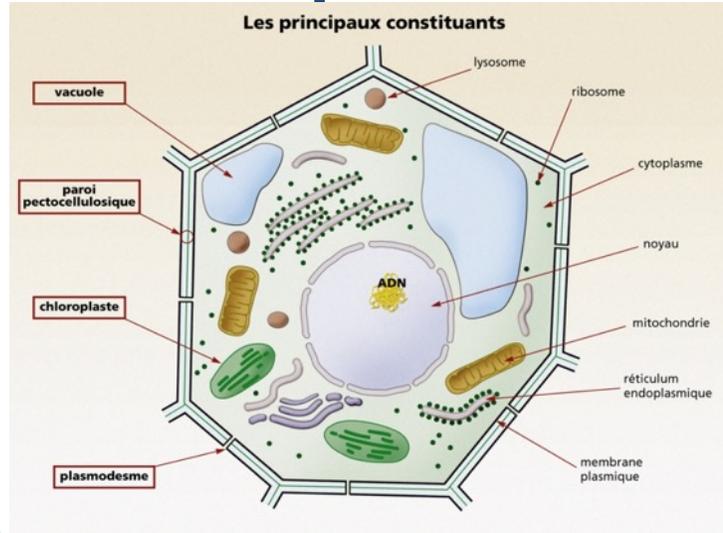
Qu'est ce que c'est?



ADN



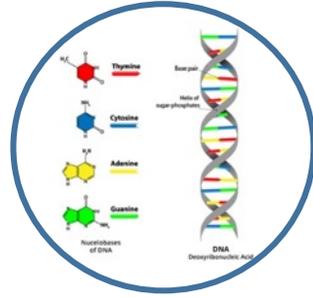
ARN



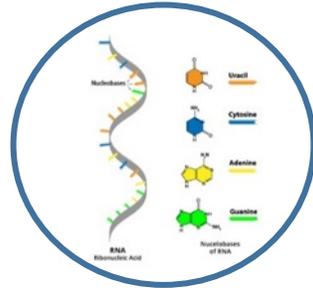
Permet de séquencer tous les acides nucléiques d'un échantillon:
-ADN (information génétique ou génome)
-ARN (expression du génome ou transcriptome)

Le séquençage à haut-débit, ou HTS (HighThroughput Sequencing)

Qu'est ce que c'est?



ADN



ARN

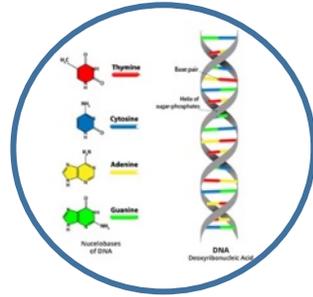
Permet de séquencer tous les acides nucléiques d'un échantillon:

-ADN (information génétique ou génome)

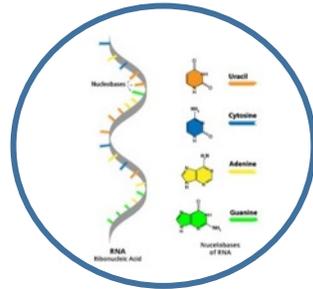
-ARN (expression du génome ou transcriptome)

Le séquençage à haut-débit, ou HTS (HighThroughput Sequencing)

Qu'est ce que c'est?



ADN



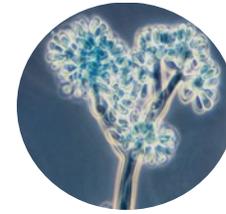
ARN



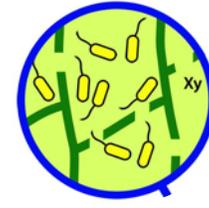
mildiou



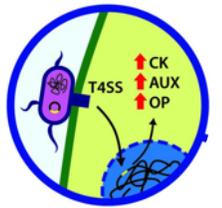
Black Rot



Botrytis



Xylella



Agrobacterium

Permet de séquencer tous les acides nucléiques d'un échantillon:

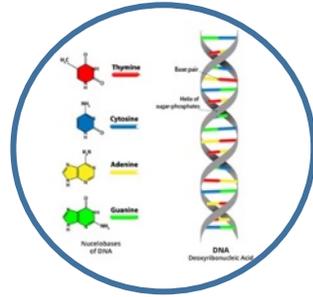
-ADN (information génétique ou génome)

-ARN (expression du génome ou transcriptome)

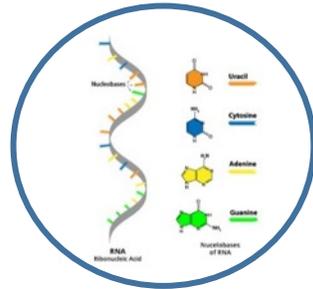
-toutes autres organismes (micro ou macro) présents au sein de l'échantillon (champignon, bactérie,

Le séquençage à haut-débit, ou HTS (HighThroughput Sequencing)

Qu'est ce que c'est?



ADN



ARN



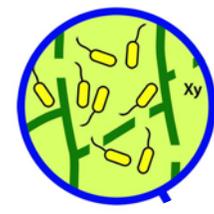
mildiou



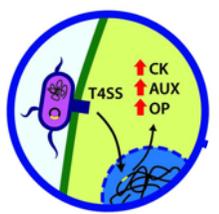
Black Rot



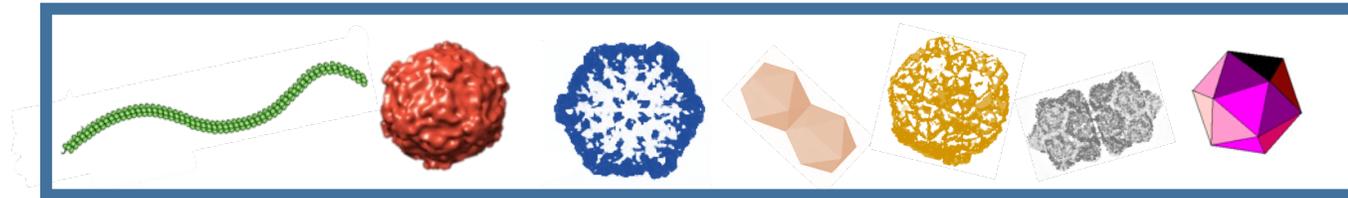
Botrytis



Xylella



Agrobacterium



Virus

Permet de séquencer tous les acides nucléiques d'un échantillon:

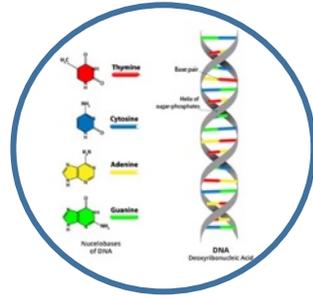
-ADN (information génétique ou génome)

-ARN (expression du génome ou transcriptome)

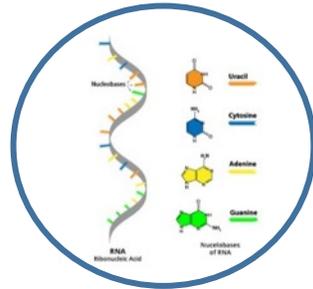
-toutes autres organismes (micro ou macro) présents au sein de l'échantillon (champignon, bactérie, virus,

Le séquençage à haut-débit, ou HTS (HighThroughput Sequencing)

Qu'est ce que c'est?



ADN



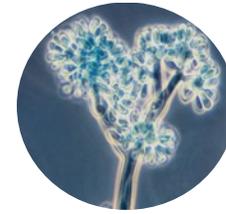
ARN



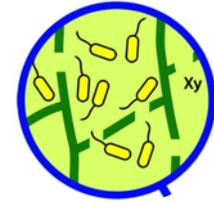
mildiou



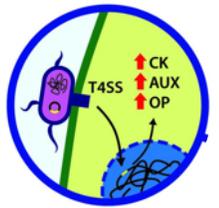
Black Rot



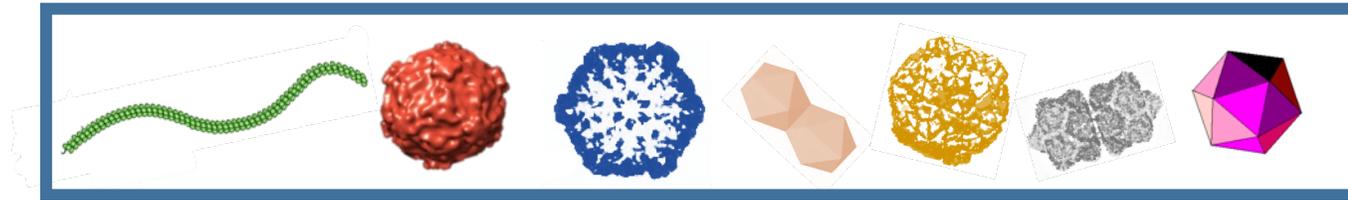
Botrytis



Xylella



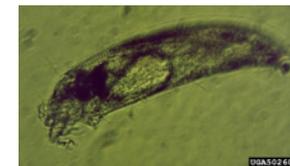
Agrobacterium



Virus



Erinose



Colomerus vitis



Environnement de la vigne



Permet de séquencer tous les acides nucléiques d'un échantillon:

-ADN (information génétique ou génome)

-ARN (expression du génome ou transcriptome)

-toutes autres organismes (micro ou macro) présents au sein de l'échantillon (champignon, bactérie, virus, le reste de l'environnement vigne ...)

Le séquençage à haut-débit

D'où ça vient?

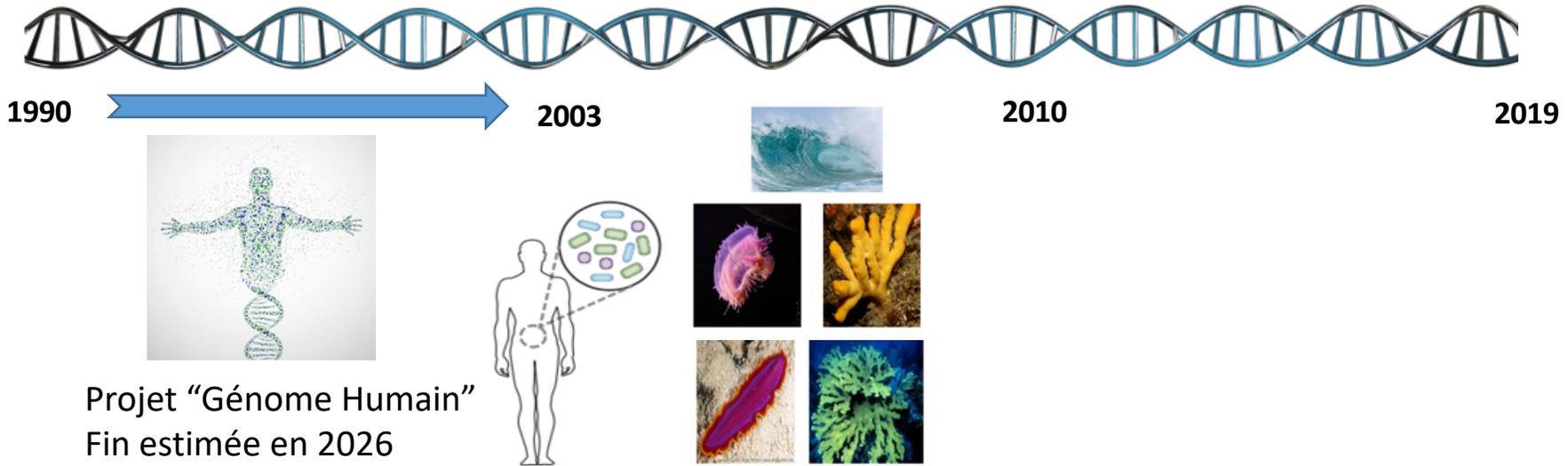
Le séquençage à haut-débit D'où ça vient?



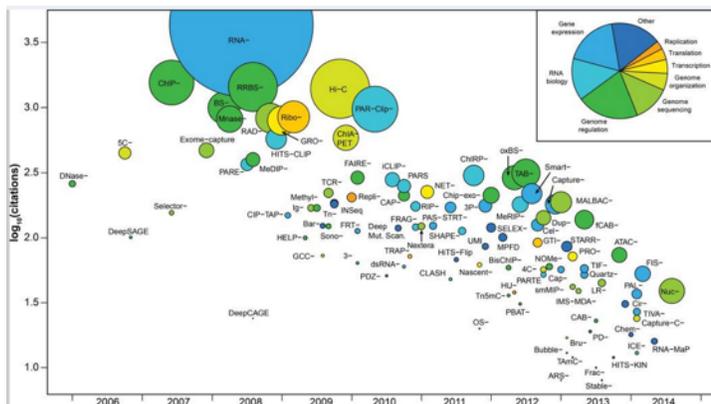
Projet "Génome Humain"
Fin estimée en 2026

Le séquençage à haut-débit

D'où ça vient?

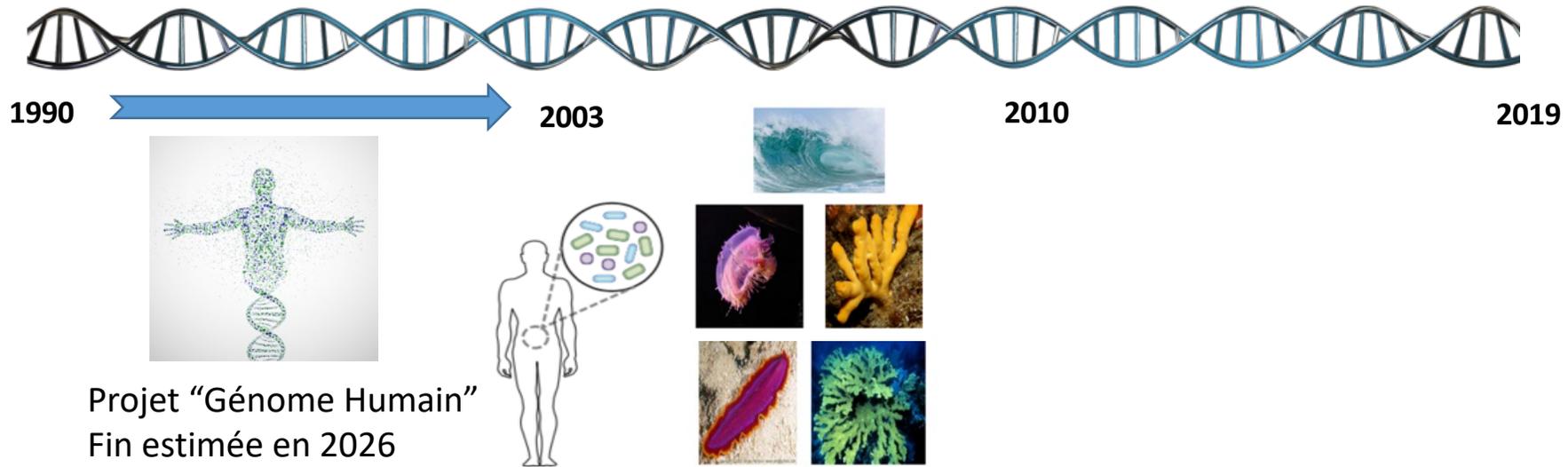


- Transcriptomique
- Métagénomique Environnementale:
 - microbiote humain
 - métagénome marin...

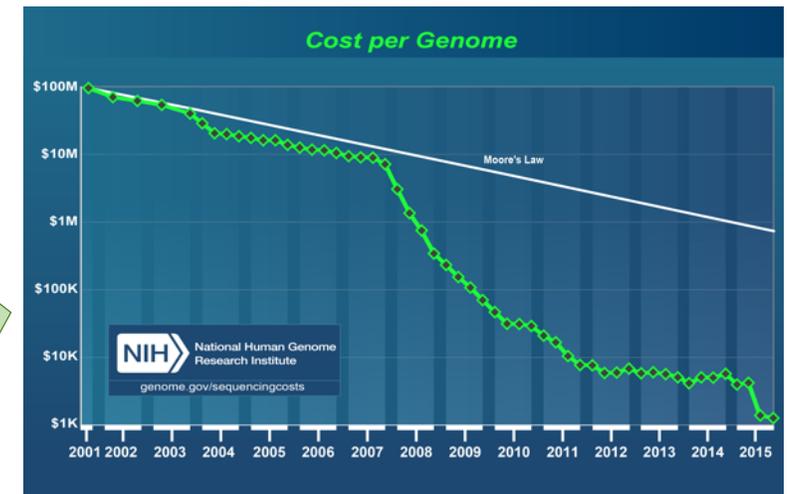
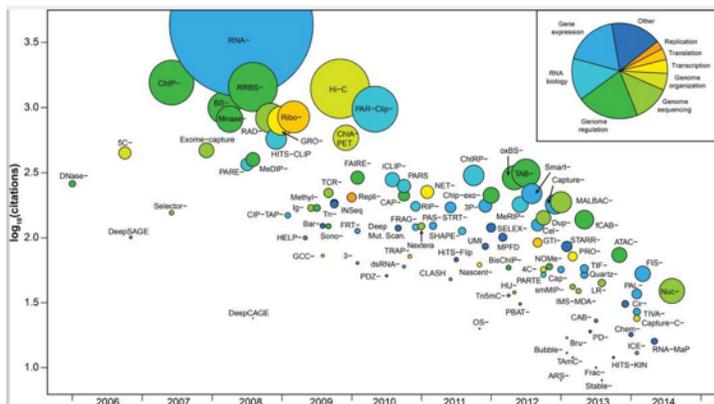
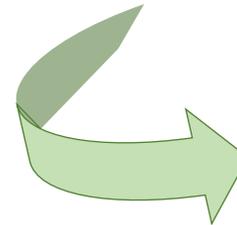


Le séquençage à haut-débit

D'où ça vient?

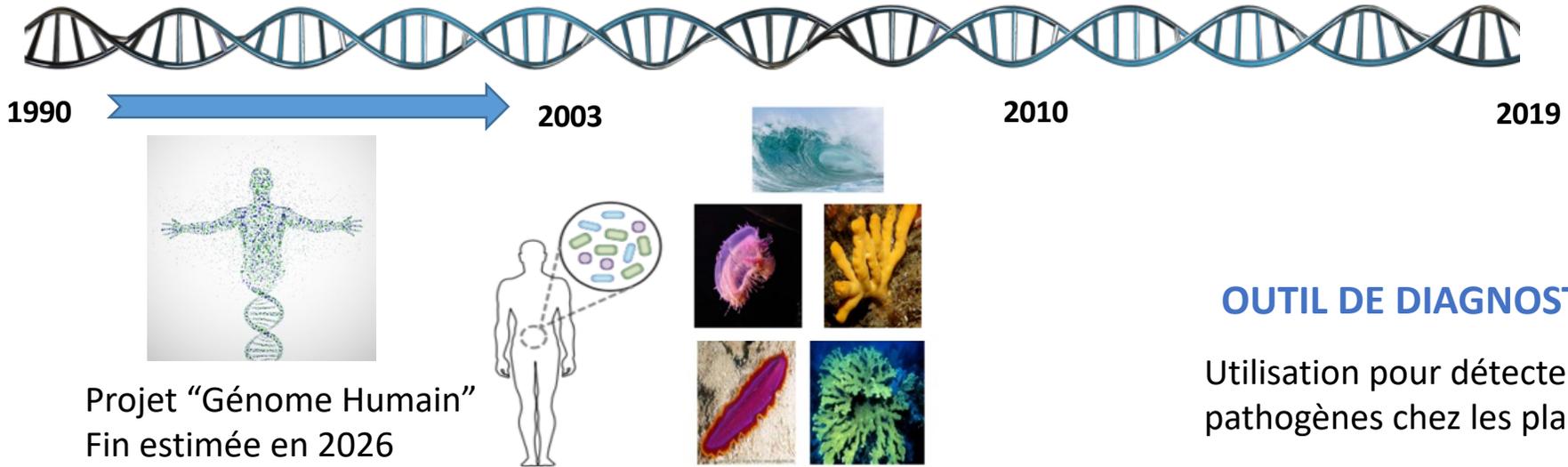


- Transcriptomique
- Métagénomique Environnementale:
 - microbiote humain
 - métagénome marin...



Le séquençage à haut-débit

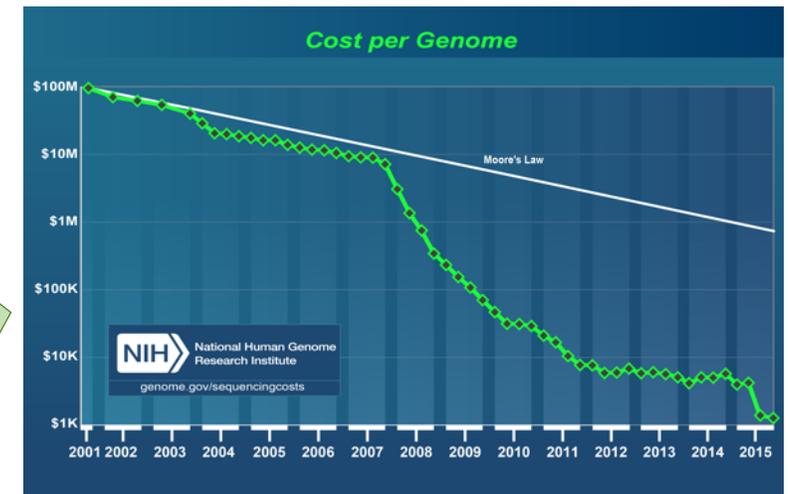
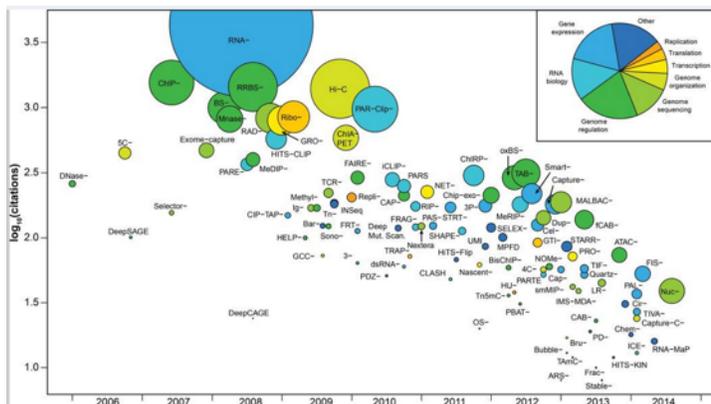
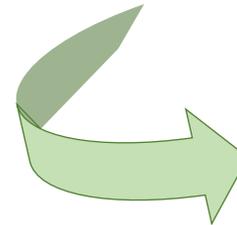
D'où ça vient?



OUTIL DE DIAGNOSTIC

Utilisation pour détecter des pathogènes chez les plantes

- Transcriptomique
- Métagénomique Environnementale:
 - microbiote humain
 - métagénome marin...



Le séquençage à haut-débit

A quoi ça sert?

Le séquençage à haut-débit

A quoi ça sert?

SEQUENCAGE DU GENOME

- Différents cépages.

Le séquençage à haut-débit

A quoi ça sert?

SEQUENCAGE DU GENOME

- Différents cépages.

OUTIL DE TRANSCRIPTOMIQUE

- Identifier gène(s) et/ou voie(s) métabolique(s) dérégulé(e)s entre plantes traitées/non-traitées, infectées/non-infectées...

Le séquençage à haut-débit

A quoi ça sert?

SEQUENCAGE DU GENOME

- Différents cépages.

OUTIL DE TRANSCRIPTOMIQUE

- Identifier gène(s) et/ou voie(s) métabolique(s) dérégulé(e)s entre plantes traitées/non-traitées, infectées/non-infectées...

OUTIL DE DIAGNOSTIC

- Détection de virus (et pathogènes) connus qui infectent la vigne
- Possibilité de reconstituer le génome viral avec la détection de nouveaux variants (meilleure compréhension de la diversité génétique)
- Détection de nouveau virus (et pathogènes) qui infectent la vigne

Le séquençage à haut-débit

Outil de diagnostic et détection de nouveaux virus

- Avant 2010, environ 50 espèces virales étaient connues pour infecter la vigne.

Le séquençage à haut-débit

Outil de diagnostic et détection de nouveaux virus

- Avant 2010, environ 50 espèces virales étaient connues pour infecter la vigne.
- Depuis 2011, découverte de au moins 23 nouvelles espèces virales: RNA (+, -), dsRNA, sDNA, DNA

GSyV1, GRVfV (Tymoviridae, Marafivirus, RNA+)

GRGV (Tymoviridae, Maculavirus, RNA+)

GPGV (Betaflexiviridae, Trichovirus, RNA+)

GVD, GVF, GVH, GVI, GVG, GVJ, GVK, GVL, GVM, GVT (Betaflexiviridae, Vitivirus, RNA+)

GFabV (Secoviridae, Fabavirus, RNA+)

GEV (Luteoviridae, Enamovirus, RNA+)

GCSV (Reoviridae, dsRNA)

GGVA (Geminiviridae, Geminivirus, sDNA)

GRBV (Geminiviridae, Glabrovirus, sDNA)

GVCV (Caulimoviridae, Badnavirus, DNA)

GRLDaV (Caulimoviridae, Badnavirus, DNA)

GMRV, GGDV (Phenuiviridae, RNA-)



Attention!
Tout virus n'est pas forcément pathogène.

Le séquençage à haut-débit

Outil de diagnostic avec la définition d'un virome complexe

- Le virome c'est l'ensemble des séquences virales présentes au sein d'un échantillon.

Le séquençage à haut-débit

Outil de diagnostic avec la définition d'un virome complexe

- Le virome c'est l'ensemble des séquences virales présentes au sein d'un échantillon.

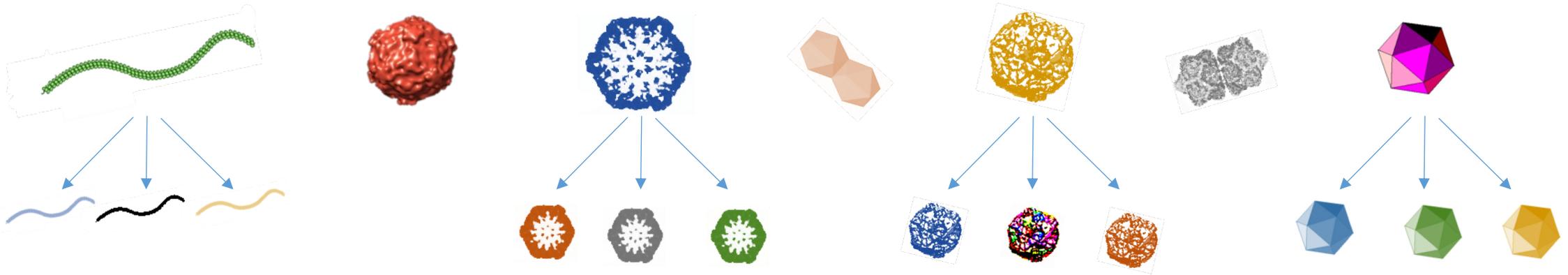


- Reconstitution des génomes complets de virus **d'espèces différentes**

Le séquençage à haut-débit

Outil de diagnostic avec la définition d'un virome complexe

- Le virome c'est l'ensemble des séquences virales présentes au sein d'un échantillon.



- Reconstitution des génomes complets de virus **d'espèces différentes et de variants différents.**

Le séquençage à haut-débit

Outil de diagnostic avec la définition d'un virome complexe

- Le virome c'est l'ensemble des séquences virales présentes au sein d'un échantillon.

Viruses	sample names																			
	L01	H2	L03	H4	L05	H6	L07	H8	L09	H10	L11	H12	L13	H14	H15	L16	H17	L18	L19	H20
GFLV RNA1	1	2	-	1	-	2	-	1	-	2	-	3	-	3	2	-	2	2	2	3
GFLV RNA2	1	1	-	1	-	1	-	1	-	2	-	2	-	2	2	-	2	1	1	1
GRSPaV	5	3	4	5	5	3	4	3	3	5	4	2	3	3	4	5	4	3+	3+	4+
HSVd	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	2	3	2	2	2	3	3	2	2	2
GYSVd1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	4	2	2	3	3	2	3	4	4	2
GFkV	1+	-	-	-	1+	1+	1	1	1	1+	1+	1+	-	1+	-	1+	1	1+	-	1
GRVfV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	1	-	1+	-	-	1
GSyV1	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1+	-	-	-
GLRaV2	-	-	-	v	-	-	-	v	-	-	-	-	-	v	-	-	v	-	-	-
GPGV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	8	1 _a	11	3	6 _a	2 _a	12 _a	2 _b	14	4	6 _b	1 _b	12 _b	7	2 _c	13	6 _c	5	9

- Reconstitution des génomes complets de virus **d'espèces différentes et de variants différents**.
- Complexité très importante, avec chaque vignes hébergent un cocktail d'espèces virales / variants viraux différents.

Nombre de combinaison ou le cocktail **d'espèces** virales différent? **14**

Nombre de combinaison ou le cocktail **de variants** viraux différent? **20**



Chaque pied de vigne au vignoble semble être différent de son voisin!

Le séquençage à haut-débit

Vers la mise en place d'un schéma de certification plus global et précis?

- ⇒ Indexage biologique (greffage sur indicateur)
- ⇒ Tests sérologiques (ELISA)
- ⇒ Tests moléculaires (PCR, RT-PCR)

Le séquençage à haut-débit

Vers la mise en place d'un schéma de certification plus global et précis?

- ⇒ Indexage biologique (greffage sur indicateur)
- ⇒ Tests sérologiques (ELISA)
- ⇒ Tests moléculaires (PCR, RT-PCR)

⇒ Cible uniquement des pathogènes connus

-Virus responsables des maladies de dégénérescence et de dépérissement
= court-noué

-népovirus: ArMV, GFLV...

-Virus responsables de l'enroulement

-Ampélo-, Closterovirus: GLRaV (leafroll associated).

-Virus responsables du complexe du bois strié

-GRSPaV, GVA, GVB.

-Virus de la marbrure (uniquement port-greffe)

-Maculavirus: GFkV.

Le séquençage à haut-débit

Vers la mise en place d'un schéma de certification plus global et précis?

- ⇒ Indexage biologique (greffage sur indicateur)
- ⇒ Tests sérologiques (ELISA)
- ⇒ Tests moléculaires (PCR, RT-PCR)

⇒ Cible uniquement des pathogènes connus

-Virus responsables des maladies de dégénérescence et de dépérissement
= court-noué

-népovirus: ArMV, GFLV...

-Virus responsables de l'enroulement

-Ampélo-, Closterovirus: GLRaV (leafroll associated).

-Virus responsables du complexe du bois strié

-GRSPaV, GVA, GVB.

-Virus de la marbrure (uniquement port-greffe)

-Maculavirus: GFkV.

Estimated cost for conventional virus testing

Assay	cost/selection
PCR assays (37 pathogens)	\$1,200
ELISA (4 pathogens)	\$250
Herbaceous host indexing	\$100
Woody host indexing	\$350
Total	\$1,900

Minimum release time: 2 - 3 years



Al Rwahnih, 2017

Le séquençage à haut-débit

Vers la mise en place d'un schéma de certification plus global et précis?

Avec le séquençage à haut débit (HTS)

Tester tous les virus connus et inconnus.

Coût très similaire

Retour en moins de 6 mois.



Estimated cost for conventional virus testing

Assay	cost/selection
PCR assays (37 pathogens)	\$1,200
ELISA (4 pathogens)	\$250
Herbaceous host indexing	\$100
Woody host indexing	\$350
Total	\$1,900

Minimum release time: 2 - 3 years



Al Rwahnih, 2017

Le séquençage à haut-débit

Vers la mise en place d'un schéma de certification plus global et précis?

Avec le séquençage à haut débit (HTS)

Tester tous les virus connus et inconnus.

Coût très similaire

Retour en moins de 6 mois.



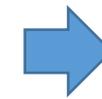
Améliorations possibles et nécessaires:

-déterminer la meilleure période d'échantillonnage

-développement de techniques de préparation des échantillons

-déterminer la technique permettant une détection de virus la plus exhaustive possible

-amélioration des outils bio-informatiques



Travail en cours

Le séquençage à haut-débit, une nouvelle technique de détection des virus chez la vigne



Nouvelle technique (environ 10 ans)



Détection de plus de 25 nouveaux virus (Attention tout virus n'est pas pathogène)



Définition du virome (ensemble des virus dans un échantillon) plus complexe qu'attendu



HTS, gage d'un contrôle qualité et d'une vue exhaustive des virus présents au sein d'un échantillon



Il reste encore du travail à faire avant la mise en place pour la certification